



УДК 577.352(2+332)+547.963.4

13-ЦИС- И ПОЛНОСТЬЮ-ТРАНС-ИЗОМЕРЫ 11,12-ДИДЕГИДРОБАКТЕРИОРОДОПСИНА

Данишина С. В.*, Драчев А. Л., Драчев Л. А.,
Каулен А. Д., Мицнер Б. И.***, Хитрина Л. В.,
Ходонов А. А.**

Межфакультетская проблемная научно-исследовательская лаборатория
молекулярной биологии и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского
МГУ им. М. В. Ломоносова;

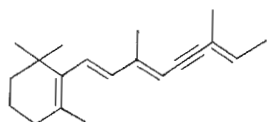
* Институт биологической физики Академии наук СССР,
Пуцдино Московской обл.;

** Московский институт тонкой химической технологии
им. М. В. Ломоносова

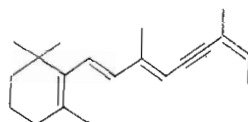
13-цис- и полностью-транс-Изомеры 11,12-дидегидроретиналя образуют с бактериоопсином хромопротеиды, вступающие в фотоцикл. Термо- и фотоизомеризация двойной связи при С13 у этих хромопротеидов затруднена по сравнению с бактериородопсином. При освещении *полностью-транс*-11,12-дидегидробактериородопсина удастся непосредственно наблюдать изомеризацию двойной связи при С13. Наряду с этим наблюдается образование формы, отличной от 13-цис-изомера и имеющей фотоцикл, похожий на фотоцикл 13-цис-бактериородопсина. *полностью-транс*-11,12-Дидегидробактериородопсин обладает протонтранспортной активностью.

Замена ретиналя его синтетическими аналогами является одним из перспективных методов исследования бактериородопсина (см. обзоры [1-3]).

Мы синтезировали 11,12-дидегидроретиналь, аналог ретиналя, содержащий тройную связь при С11 вместо двойной, что уменьшает длину полиеновой цепи и изменяет пространственное расположение С1-С11-фрагмента относительно концевой участка цепи. У хромопротеидов, полученных из бактериоопсина и *полностью-транс*- и 13-цис-изомеров 11,12-дидегидроретиналя, исследована изомеризация двойной связи при С13, а также особенности фотохимического цикла и фотоэлектрических ответов. Ранее в группе Остерхельга. [4] был получен 7,8-дидегидробактериородопсин, сохранявший около половины протоитранспортной активности бактериородопсина. При экстракции 7,8-дидегидроретиналя из этого хромопротеида, адаптированного к свету или к темноте, доля *полностью-транс*-изомера составляла 70-90%.



(Ia) R = CH₂OH
(IIa) R = CHO



(Ib) R = CH₂OH
(IIb) R = CHO

Изомерные полиеналы (IIa) и (IIb) образуют с бактериоопсином хромопротеиды (таблица). Полученные препараты стабильны. Судя по положению максимумов поглощения и быстрой кинетике фотоиндуцированных оптических изменений, при их хранении в темноте при 3-5° С за 1 сут

Принятые сокращения: MES - N-морфолиноэтансульфокислота.

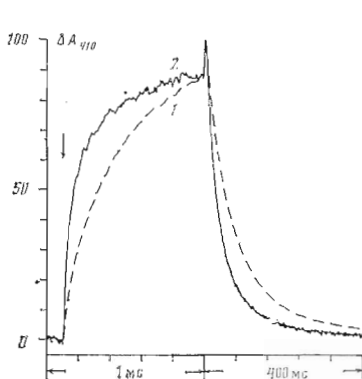


Рис. 1

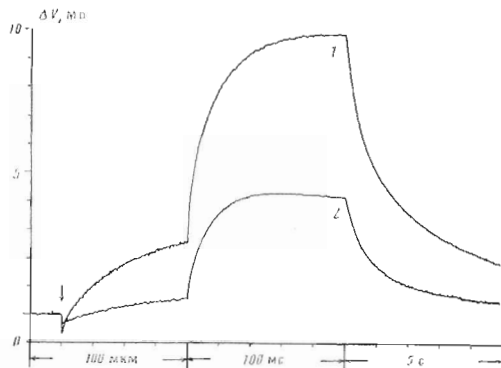


Рис. 2

Рис. 1. Изменения поглощения при 410 нм (ΔA_{410}) после освещения бактериородопсина (1) (предварительно адаптирован к свету) и *полностью-транс*-11,12-дидегидробактериородопсина (2) лазерной вспышкой ($\lambda=532$ нм, $t_{1/2}=15$ нс, энергия в зеленом световом импульсе 50 мДж). Максимальная амплитуда фотоответа принята за 100%. Среда инкубации — 100 мМ NaCl, 5 мМ MES, pH 6,0 (6°C)

Рис. 2. Генерация разности электрических потенциалов бактериородопсином (1) (предварительно адаптирован к свету) и *полностью-транс*-11,12-дидегидробактериородопсином (2) в ответ на вспышку энергии 15 мДж. Ассоциацию с коллодиевой пленкой, пропитанной декановым раствором лецитина (70 мг/мл), содержащим октадециламин (0,5 мг/мл), и последующие измерения проводили при 9°C (среда — см. подпись к рис. 1)

заметной изомеризации не происходит. В фотоцикле хромопротеида, полученного инкубацией бактериородопсиновых мембран и *полностью-транс*-11,12-дидегидроретиналя, участвует интермедиат, который по спектральным характеристикам, времени жизни и уровню накопления близок к промежуточной форме *M*, известной для бактериородопсина (рис. 1). Фотоэлектрические ответы этого хромопротеида в мембранах, ассоциированных с коллодиевой пленкой, пропитанной раствором лецитина в декане (рис. 2), свидетельствуют о существовании у него протонтранспортной активности, причем по кинетике генерации разности электрических потенциалов в ответ на вспышку он близок к бактериородопсину (ср. [5, 6]).

Минимум на дифференциальном спектре, отражающем фотоиндуцированные изменения *полностью-транс*-изомера 11,12-дидегидробактериородопсина, совпадает по положению с максимумом поглощения этого хромопротеида (рис. 3). Коротковолновый интермедиат типа *M* является основным компонентом его фотоцикла, наблюдаемым спустя несколько микросекунд после вспышки. Интермедиат, кинетически близкий к известной для бактериородопсина форме O_{640} , у этого хромопротеида мы не наблюдали.

При освещении вспышкой 13-*цис*-изомера 11,12-дидегидробактериородопсина отрицательная полоса в дифференциальном спектре по амплитуде

Максимумы α -полос альдегидов* (λ , нм), их шиффовых оснований с *n*-бутиламином (SB)*, протонированных шиффовых оснований (SBH+)** и хромопротеидов, образованных этими альдегидами с бактериородопсином***

Соединение	Альдегид	SB	SBH+	Хромопротеид
<i>полностью-транс</i> -Ретиналь (IIa) (IIб)	380	360	440	568
	364	343	418	539
	358	347	417	519

* Метанол.

** 0,1 М HCl в метаноле.

*** 100 мМ NaCl, 5 мМ MES, pH 6,0.

меньше, чем у *полностью-транс*-изомера, и сдвинута в коротковолновую область относительно максимума поглощения (рис. 3), что обусловлено образованием не менее двух длинноволновых интермедиатов (рис. 3). Скорость образования первого находится за пределами достигнутого временного разрешения (рис. 4, 1), тогда как второй при комнатной температуре возникает за миллисекунды. Время релаксации прироста оптической плотности в длинноволновой области заметно превышает время жизни интермедиата М. Дифференциальный максимум, отвечающий первому длинноволновому интермедиату, расположен при ~ 575 нм, а второму — при ~ 590 нм. Кривые 1 на рис. 4 и 5 отражают изменения их вкладов в поглощение при разных длинах волны (на рис. 4 и 5 в пробах различается количество белка).

В фотоцикле 13-*цис*-11,12-дидегидробактериородопсина при рН 6–7 интермедиат М отсутствует; во всяком случае изменение поглощения при 410 нм исчезает по мере очистки исходного альдегида. Приведенные на рис. 4 данные относятся к препаратам, полученным из 13-*цис*-альдегида (IIб) после его четырехкратной хроматографической очистки. В растворах низкой ионной силы приросту оптической плотности в длинноволновой области (560–650 нм) соответствует поглощение протонов из внешней среды; при повышении ионной силы наблюдается выброс протонов, связанный с образованием интермедиата М из примеси *полностью-транс*-изомера (ср. кривые 3 и 4 на рис. 4). Можно думать, что этот эффект обусловлен диссоциацией групп, непосредственно не участвующих в переносе протона.

Как уже отмечалось, темновая изомеризация двойной связи при С13 в 11,12-дидегидробактериородопсине сильно замедлена. Свидетельствующие о такой изомеризации незначительные изменения быстрой кинетики фотоиндуцированных спектральных изменений наблюдаются лишь спустя несколько суток при 3–5°С (рН 6). Предварительное освещение 13-*цис*-изомера хромопротеида галогенной лампой (100 Вт, тепловой фильтр — 2 см 5% раствора CuSO_4) увеличивает амплитуду интермедиата М и изменения основной полосы поглощения, индуцируемые последующей вспышкой. У *полностью-транс*-11,12-дидегидробактериородопсина предварительное освещение приводит к противоположным результатам. Кроме того, непрерывное освещение приводит к батохромному сдвигу и увеличению амплитуды полосы поглощения у 13-*цис*-хромопротеида и к противоположным изменениям в спектре *полностью-транс*-хромопротеида. Вблизи равновесия фотоизомеризации амплитуда полосы поглощения интермедиата М составляет $\sim 85\%$ от величины, характерной для исходного препарата *полностью-транс*-11,12-дидегидробактериородопсина. Эта равновесная амплитуда одинакова после освещения для обоих изомерных хромопротеидов. Величина $t_{1/2}$, характеризующая установление равновесия фотоизомеризации, также одинакова и при 6°С составляет ~ 6 мин (фотоstationарное состояние устанавливается не менее чем за 40 мин), что на два порядка превышает $t_{1/2}$ при адаптации к свету самого бактериородопсина (при условии, что последний получен рекомбинацией апомембран с ретиналем).

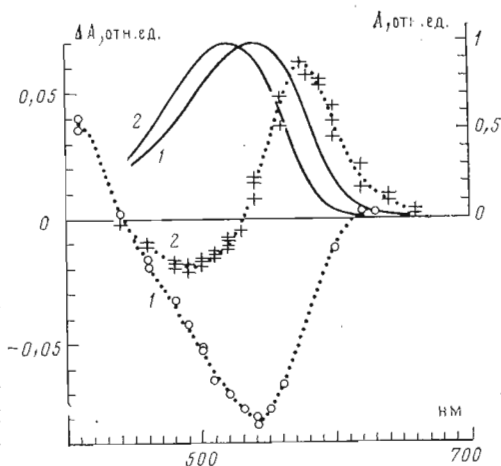


Рис. 3. Спектры поглощения (сплошные линии; сняты против суспензии апомембран) и фотоиндуцированные дифференциальные спектры *полностью-транс*-11,12-дидегидробактериородопсина (1) и его 13-*цис*-изомера (2) через 0,7 мс после вспышки (пунктирные линии) (условия — см. подпись к рис. 1). Амплитуда полос в спектрах поглощения принята равной 1

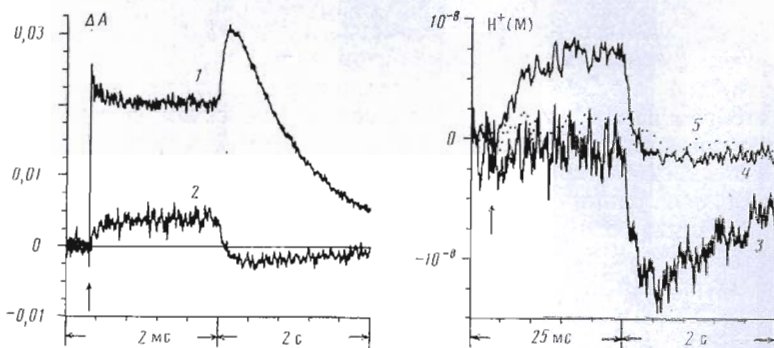


Рис. 4. Изменения оптической плотности при 580 нм (1) и 440 нм (2), а также изменения pH (3-5) при освещении 13-цис-11,12-дидегидробактериородопсина (1-4) и апомембран (5) лазерной вспышкой (15 мДж) при 1° С. Среды инкубации: 1, 2 - 100 мМ NaCl, 5 мМ MES, pH 6,0; 3 - 20 мкМ фосфат калия, pH 6,9; 4, 5 - 20 мкМ фосфат калия, 100 мМ NaCl, pH 6,9. При регистрации pH измеряли оптическую плотность при 455 нм после добавления 5 мкМ пиронина

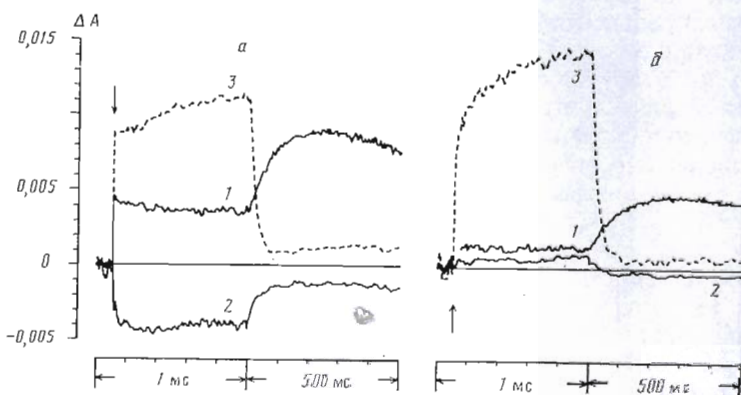


Рис. 5. Изменения оптической плотности при 600 нм (а) и 620 нм (б) после освещения лазерной вспышкой (15 мДж) 13-цис-11,12-дидегидробактериородопсина (1) и полностью-транс-11,12-дидегидробактериородопсина (2). Кривая 3 в отличие от кривой 2 получена после предварительного освещения препарата 15 вспышками (среда - см. подпись к рис. 1)

Итак, при освещении полностью-транс-11,12-дидегидробактериородопсина наблюдается изомеризация двойной связи при С13. Наряду с этим 11,12-дидегидробактериородопсин при освещении превращается в форму, фотоцикл которой отличен от фотоциклов полностью-транс- и 13-цис-форм. Сравнение фотоответов при разных длинах волны показывает, что в этом фотоцикле присутствует более чем один длинноволновый интермедиат (рис. 5). Судя по фотоответам, регистрируемым при разных длинах волн, полностью-транс-11,12-дидегидробактериородопсин на свету превращается по меньшей мере в две формы. Если при освещении постоянным светом преобладает накопление 13-цис-изомера, то под действием 5-15 лазерных вспышек ($\lambda=532$ нм, $t_{1/2}=15$ нс) главным продуктом оказывается другая форма.

Отчетливое присутствие в фотоцикле этой формы длинноволновых интермедиатов сближает его с фотоциклом 13-цис-бактериородопсина и его аналогов, содержащих остатки 13-цис-полиеналя. Хотя нельзя полностью исключить сохранение полностью-транс-конфигурации хромофора при образовании этой формы, более вероятно его фотоизомеризация по какой-либо из двойных С=C- или же по С=N-связи. Если это так, то налицо первый случай, когда обнаружен фотоцикл у аналога бактериородопсина, отличающегося конфигурацией двойной связи не при С13-атоме.

Затруднения изомеризации и *полностью-транс*-→*13-цис*-фотоизомеризацию наблюдали ранее при замене β-иононового кольца на фенильное или при введении 4-кетогруппы [7–9]. Для природного бактериородопсина *полностью-транс*-→*13-цис*-фотоизомеризация была обнаружена в пленках пурпурных мембран при пониженной влажности [10].

Экспериментальная часть

Измерения фотоиндуцированных изменений рН выполняли согласно работам [11–13]. Другие методы исследования хромопротеидов также подробно описаны нами ранее [8]. Все оптические измерения проводили в режиме одиночных вспышек без накопления. При построении фотоиндуцированных дифференциальных спектров каждой длине волны отвечала новая проба. Мембраны, содержащие бактериородопсин и хромопротеиды с остатками изомерных 11,12-дидегидроретиналей, получали из соответствующих альдегидов и бактериоопсиновых мембран (апомембран). Такие мембраны для краткости называют бактериородопсином и хромопротеидами.

Исходные *полностью-транс*- и *13-цис*-изомеры 11,12-дидегидроретинала (Ia, б) синтезировали по методикам, опубликованным ранее [14, 15]. Их физико-химические и спектральные характеристики полностью соответствовали литературным данным [14–16].

полностью-транс-11,12-Дидегидроретиналь (IIa). К раствору 0,45 г спирта (Ia) в 50 мл пентана при перемешивании и 20°С в атмосфере аргона и темноте добавляли 2,5 г активного диоксида марганца и продолжали перемешивание 2 ч. Окислитель отделяли фильтрованием через слой оксида алюминия (IV степени активности по Брокману), промывали 100 мл пентана, из объединенных фильтров удаляли растворитель. Выход желтого масла 0,39 г (87%). ИК-спектр (пленка, ν , см⁻¹): 2745 сл., 1663 с. (—CHO), 2160 с. (C≡C), 1600 с., 965 с. (CH=CH). УФ-спектр, $\lambda_{\text{макс}}$, нм (ϵ), CH₃OH: 220 (10 600), 243 (10 100), 290 плечо (12 600), 364 (26 100). ПМР-спектр (δ , м. д.): 10,02 (1H, д, J 8,2 Гц, 15-H); 6,38 (1H, д, J 16 Гц, 7-H); 6,195 (1H, д, кв, J 8,2 и 1,5 Гц, 14-H); 6,15 (1H, д, J 16 Гц, 8-H); 5,59 (1H, с, 10-H); 2,34 (3H, д, J 1,5 Гц, 13-CH₃); 2,09 (3H, д, J 1,0 Гц, 9-CH₃); 2,05 (2H, м, 4-CH₂); 1,70 (3H, д, J 0,7 Гц, 5-CH₃); 1,6 и 1,48 (2H, м, 3- и 2-CH₂); 1,02 (6H, с, 1,1'-CH₃).

13-цис-11,12-Дидегидроретиналь (IIб) получен аналогично соединению (IIa) из 0,6 г спирта (Iб) и 4,0 г активного диоксида марганца. Выход желтого масла 0,47 г (79%). ИК-спектр (пленка, ν , см⁻¹): 2735 сл., 1670 с. (—CHO), 2150 с. (C≡C), 1590 с. (CH=CH). УФ-спектр, $\lambda_{\text{макс}}$, нм (ϵ), CH₃OH: 220 (12 000), 246 (13 000), 288 плечо (12 500), 357,5 (20 300). ПМР-спектр (δ , м. д.): 10,105 (1H, д, J 8,2 Гц, 15-H); 6,41 (1H, д, J 16,5 Гц, 7-H); 6,19 (1H, д, J 16,5 Гц, 8-H); 6,16 (1H, д, кв, J 8,2 и 1,5 Гц, 14-H); 5,64 (1H, с, 10-H); 2,20 (3H, д, J 1,5 Гц, 13-CH₃); 2,13 (3H, д, J 1,0 Гц, 9-CH₃); 2,05 (2H, м, 4-CH₂); 1,74 (3H, д, J 0,7 Гц, 5-CH₃); 1,63 и 1,48 (2H, м, 3- и 2-CH₂); 1,05 (6H, с, 1,1'-CH₃).

Альдимины изомерных дегидроретиналей с *n*-бутиламино синтезировали стандартным методом в присутствии молекулярных сит 3 Å.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мицнер Б. И., Ходонов А. А., Звонкова Е. Н., Евстигнеева Р. П. // Биоорганич. химия. 1986. Т. 12. № 1. С. 5–53.
2. Драчев А. Л., Драчев Л. А., Евстигнеева Р. П., Каулен А. Д., Лазорова Ц. Р., Лайтгер А. А., Мицнер Б. И., Скулачев В. П., Хитрина Л. В., Чекулаева Л. Н. // Биол. мембраны. 1984. Т. 1. № 11. С. 1125–1142.
3. Stoerkenius W., Logez R. H., Bogomolni R. A. // Biochim. et biophys. acta. 1979. V. 505. № 3–4. P. 215–278.
4. Gärtner W., Oesterhelt D., Seifer-Schiller E., Towner P., Hopf H., Böhm I. // J. Amer. Chem. Soc. 1984. V. 106. № 19. P. 5654–5659.
5. Драчев Л. А., Каулен А. Д., Скулачев В. П., Хитрина Л. В., Чекулаева Л. Н. // Биохимия. 1981. Т. 46. № 6. С. 998–1005.

6. *Drachev L. A., Kaulen A. D., Khitrina L. V., Skulachev V. P.* // Eur. J. Biochem. 1981. V. 117. № 3. P. 461—470.
7. *Maeda A., Asato A. E., Liu R. S., Yoshizawa T.* // Biochemistry. 1984. V. 23. № 11. P. 2507—2513.
8. *Драчев Л. А., Зорина В. В., Мицнер Б. И., Хитрина Л. В., Ходонов А. А., Чекулаева Л. Н.* // Биохимия. 1987. Т. 52. № 9. С. 1559—1569.
9. *Хитрина Л. В., Данишина С. В., Драчев А. Л., Драчев Л. А., Каулен А. Д., Лазорова Ц. Р., Зорина В. В.* // Тез. докл. Междунар. конф. «Ретинальсодержащие белки». Иркутск АН СССР — FEBS, 1986. С. 81.
10. *Kouyama T., Bogomolni R. A., Stoebenius W.* // Biochem. J. 1985. V. 48. № 2. P. 201—208.
11. *Drachev L. A., Kaulen A. D., Skulachev V. P.* // FEBS Lett. 1984. V. 178. № 2. P. 331—335.
12. *Драчев Л. А., Каулен А. Д., Скулачев В. П.* // Докл. АН СССР. 1985. Т. 281. С. 176—180.
13. *Dencher N. A., Burghaus P. A., Grzesiek S.* // Proceeding of the Symposium of light-sensitive proteins/Ed. Ovchinnikov Yu. A. Utrecht, The Netherlands: VNU Science Press, 1987. P. 217—230.
14. *Ходонов А. А., Первушина Е. А., Мицнер Б. И., Звонкова Е. И., Евстигнеева Р. П.* // Биооргани. химия. 1984. Т. 10. № 3. С. 408—414.
15. *Ходонов А. А., Ткачевская Е. М., Мицнер Б. И., Звонкова Е. Н.* // Биооргани. химия. 1984. Т. 10. № 10. С. 1409—1413.
16. *Olive J.-L., Mousseron-Ganet M., Domand J.* // Bull. Soc. chim. France. 1969. № 9. P. 3247—3252.

Поступила в редакцию
15.III.1988

11,12-DIDEHYDRORETINAL-CONTAINING ALL-TRANS- AND 13-CIS-ANALOGUES OF BACTERIORHODOPSIN

DANSHINA S. V., DRACHEV A. L.*, DRACHEV L. A.*, KAULEN A. D.*, MITSNER B. I.**,
KHITRINA L. V.*, KHODONOV A. A.**

*Institute of Biological Physics, Academy of Sciences of the USSR,
Pushchino, Moscow Region;*

** A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry,
M. V. Lomonosov Moscow State University;*

*** M. V. Lomonosov Institute of Chemical Technology, Moscow*

13-*cis*- and *all-trans*-Isomers of 11,12-didehydroretinal form, with bacteriorhodopsin, chromoproteins, which are capable of photocycling. The chromoproteins exhibit more hindered 13-*cis*→*all-trans*- thermal and photoisomerization in comparison with the natural bacteriorhodopsin and undergo *all-trans*→13-*cis*- photoisomerization. Kinetic studies indicated also the presence of a novel photoactive *cis*-like form. 11,12-Didehydrobacteriorhodopsin has considerable proton pump activity.